

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501333

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月9日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 39/02

9284-4C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平5-509495	(71) 出願人	スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)11月13日		アメリカ合衆国ペンシルベニア州19101、 フィラデルフィア、ワン・フランクリン・ ブラザ(番地の表示なし)、ビー・オー・ ボックス7929
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)5月13日	(72) 発明者	デアウェスター、ドナルド・エイ
(86) 国際出願番号	PCT/US 92/09944		アメリカ合衆国ネブラスカ州68506、リン カーン、デイビーズ・ドライブ7640番
(87) 国際公開番号	WO 93/10216	(72) 発明者	ロバーツ、デイビッド・エス
(87) 国際公開日	平成5年(1993)5月27日		アメリカ合衆国ネブラスカ州68510、リン カーン、ロックハースト・ドライブ1020番
(31) 優先権主張番号	792, 488	(74) 代理人	弁理士 青山 稔 (外1名)
(32) 優先日	1991年11月15日		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, JP, US		

(54) 【発明の名称】 グラム陰性菌ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、グラム陰性菌ワクチンの新規製造方法を提供するものである。該方法は、濃縮グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な結合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の結合能を有する無機担体で吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなる。また、本発明は、該本発明方法によって製造されたワクチンを提供するものである。また、本発明は、改良が5.0% v/v未満のワクチン中無機担体の濃度からなるグラム陰性菌ワクチンを提供するものである。また、本発明は、ワクチン中の無機担体の量が本発明方法によって予め決定される無機担体からなるグラム陰性菌抗原ワクチンを提供するものである。また、本発明は、本発明のワクチンの有効量を動物に投与することからなるグラム陰性菌感染症に対する動物へのワクチン接種方法を提供するものである。

## グラム陰性菌ワクチン

1. 各種グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な結合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の結合能を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなり、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非遊離抗原調製物または最終ワクチンに添加する場合よりも少ないことを特徴とするグラム陰性菌ワクチンの製造方法。
2. 無機担体の有効量が約20〜約1000内毒素単位/μlの範囲の吸着調製物中の遊離内毒素濃度によって示される請求項1記載の方法。
3. 無機担体が水酸化アルミニウムゲルである請求項1記載の方法。
4. グラム陰性菌抗原調製物がイ・コリ (*E. coli*) からなる請求項1記載の方法。
5. グラム陰性菌抗原調製物がアクチノバシラス・プリアロニウモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) からなる請求項1記載の方法。
6. グラム陰性菌抗原調製物が最終ワクチンの少なくとも10倍濃縮されている請求項1記載の方法。
7. 請求項1記載の方法によって製造されたワクチン。
8. 改良が5.0% v/v未満であるワクチン中の無機担体の濃度からなる改良グラム陰性菌ワクチン。
9. ワクチン中の無機担体の量が、各種グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な結合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の結合能を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなる方法によって予め測定され、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非遊離抗原調製物または最終ワクチンに添加されるよりも少ないことを特徴とする無機担体からなるグラム陰性菌ワクチン。
10. 請求項7または8のワクチンの有効量を動物に投与することと特徴とするグラム陰性菌感染症に対する動物へのワクチン接種方法。

ワクチンを製造するために殺したグラム陰性菌の培養物の遊離内毒素含量は、製造者の技術に従って変わる。1μl中に、20マイクログラム ( $2 \times 10^{-4}$  グラム) 程度、または1ミリグラム ( $10^{-3}$  グラム) 程度含まれる。ワクチン製造者は、遊離内毒素を減少させるいくつかの方法を使用した。1つの方法は、遠心または濾過によって細菌細胞を収獲すること、および内毒素に富んだ培養液を廃棄することを含む。もう1つの方法は、水酸化アルミニウムゲル (Aゲル) などの不溶性アルミニウム (A) またはカルシウム化合物 (担体) に培養物を吸着させることを含む。

Aゲルによる吸着は、溶液から遊離内毒素のほとんどを除去し易くする。幾人かの製造者は、ゲルに吸収される内毒素および他の培養生成物を有するゲルを沈殿させた後、上澄み液をデカントして残りの遊離内毒素を除去させる。該細菌は、該ゲルに吸着されず、この場合、それらは、通常、沈殿し、上澄み液は透明になる。デカントは、すべてが沈殿し、液体が透明になるまで延期しなければならない。

培養物から細菌を収獲した場合でも、あるいはアルミニウムまたはカルシウム化合物による吸着後に沈殿が起こった場合でも、該物質を、通常、単純な水性液体 (水、生理食塩水またはバッファ溶液) に再懸濁させる。アッセイは、通常、遊離内毒素含量の予想外の減少を示す；この変化は、再懸濁に対する拮抗因子から算出されるよりも非常に少ない。これは、内毒素が細菌表面から流れ続け、強く結合した内毒素が担体から脱着するためである。

2つの工程は、しばしば、組み合わせられる：培地から細菌を収獲し、水性液体に再懸濁させ、次いで、吸着させる。収獲した細菌の水性懸濁液を慣用の量のAゲルで吸着させることは望ましくない結果を生じることが判明した。例えば、サルモネラ・コレラエリス (*Salmonella choleraesuis*) の水性懸濁液をAゲル2.5% v/vで吸着させると、検出可能な遊離内毒素は全くなかったが、該調製物のサルモネラ・コレラエリス (*S. choleraesuis*) に対するマウス免疫能は、ほとんど完全に除去された。ゲルが沈殿し始めるとすぐに、上澄み液は透明になり、完全な吸着を示した。

## 発明の分野

本発明は、グラム陰性菌ワクチンおよびその製造方法の分野に関する。

## 発明の背景

グラム陰性菌から製造したワクチンは、よく知られている内毒素性ショックを生じる傾向を有する。この結果、流産したり、死亡したりする。グラム陰性菌は、それらが生きており、分裂している間じゅう、外膜から内毒素をわずかに放出するが、それらの死滅以後はかなり多量に放出する。細菌性内毒素は、水道水中に自然に存在し、発熱因子と呼ばれている。熱の病例を避けるために、注射用無熱因子水は、蒸留または他の精製方法によって製造される。ヒトにおいて、1内毒素単位 (EU) 程度 (約0.1ナノグラムまたは  $10^{-10}$  グラム) の注射によって体温の一過性上昇が生じる。ヒトおよび他の哺乳動物では、大量の投与量は、内毒素性ショックおよび死亡の原因となる。

ウサギは、内毒素に対する感受性がヒトと同様であり、ウサギは、伝統的に、発熱性についてヒト用注射可能生成物を試験するために使用されてきた。ほとんどの他の動物種は、あまり敏感ではない。ウマおよびブタは、ほとんどの実験用畜産種よりもかなり敏感である。かくして、研究室では、ウサギだけが、獣医学的に注射可能な物質の内毒素活性を試験するのに好適であるが、マウスは、マクロファージ機能を度える薬物で比較的感受性になることがある。

内毒素アッセイでは、ウサギは、主として、より感度の低い *in vitro* 試験に代わられた。これは、カプトガニから抽出した液体 (カプトガニ・アメーバ細胞溶解液 (*Limulus amoebocyte lysate*) または LAL) に対する内毒素の作用に依存する。痕跡量の内毒素の添加によって、LALはゲル化される。ゲルが進行する前に、LALの透明度は、多少変化し、これは、光学密度の増加に従って分光光度計によって測定することができる。

これらの結果から、実質的に培地を含まない単純な水性液体は、ゲルの結合能を消滅しないと考えられた。これは、ゲルを非常に食欲な (avid) 状態にさせ、その結果、結合可能なすべてのものを非常にしっかりと結合する。かくして、すべての内毒素が溶液から除去されたが、細菌は、非常にしっかりと結合されており、注射後に放出されなかったのは明らかであった。これは、明らかに、免疫化を妨害した。トキシノイドを含有する不活化バツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*) 細胞の水性懸濁液を用いて、該細菌を繰り返した。Aゲル2.5% v/vによる吸着後、検出可能な遊離内毒素は全くなかったが、該調製物は、モルモットにおいて、徹底的に減少させられたアナンチキシンを中和を研究する力を有する。

前記のことは、条件の範囲の2つの極端を示す。全培養物にAゲルを添加する一極端では、ペプトンおよび培養液中の他のタンパク様物質は、ゲル上の結合部位を飽和させ、その結果、遊離内毒素を含有する多量の物質は、ゆるく結合されるか、全く結合されない。細菌の水性懸濁液にAゲルを添加する他方の極端では、ほとんど、ゲルと反応させるためのタンパク様物質がほとんどなく、それは、完全に食欲のままであり、ゲルに対して親和性を有するすべてのもの、特に、内毒素および細菌細胞をしっかりと結合する。この条件では、しっかりと結合した細菌およびその抗原性生成物は、自由には、ワクチン接種された動物の免疫系の細胞と相互作用せず、免疫化は弱い。

かくして、Aゲルの結合力が適度であり、吸着力が最適である場合、観察された範囲の極度間の条件を生じる方法が必要である。内毒素のほとんどは、しっかりと結合されており、ワクチンを安全にするが、細菌細胞および抗原の結合は、良好に免疫化させるのに充分な程度にゆるい。この最適条件は、Aゲルの結合性または親和性を適宜に調節する培地の希釈液に細菌を懸濁させることによって達成された。これは、親和性調節吸着プロセスまたは AMAP<sup>®</sup> なる語を生じた。

初期の形態の AMAP<sup>®</sup> の品質証明である実験を行った。Aゲル濃度を一定に、この場合、2.5% v/v に維持しつつ、培地の希釈液を測定して、最適な吸着を達成させた。測定の特定点は、LAL法によってアッセイされたように20〜50

0 EU/μlの遊離内毒素濃度によって示された。

サルモネラ・コレラエシス (*Salmonella choleraesuis*)、ボルデテラ・ブロンキセプチカ (*Bordetella bronchiseptica*) およびパステラ・ムルトンダ (*Pasteurella multocida*) を含む多くのグラム陰性菌による実験によって、A/gel 2.5% v/v の存在下、通常、培地を希釈してペプトンおよび他のタンパク質物質の合計濃度約 1% w/v を得た後に終点が達成されたことが判明した。これは、通常、2.5~3.5 のファクターによって培地を希釈することを必要とする。AMAP<sup>®</sup> 処理物質を動物にワクチン接種することによって、抗原能力の損失が全くなく、内毒素に対する反応の臨床的証拠が全くないことが確認された。最適な AMAP<sup>®</sup> が見いだされた。

商標名 Atrobac 3 (ボルデテラ (*bordetella*)、パステラ (*pasteurella*) およびエリジペスリックス (*erysipelothrix*)) の下に販売されており、ブタにおける繁殖性肺炎および丹毒の予防のために販売されているスミスライ・ビーチャム・アニマル・ヘルス (SmithKline Beecham Animal Health) ワクチンは、AMAP<sup>®</sup> によって製造された最初の市販品である。該方法は、ボルデテラ (*bordetella*) およびパステラ (*pasteurella*) の2つのグラム陰性菌に適用される。該生成物は、効力、および全身反応性 (内毒素性ショック) からの解放について良好な世界を達成した。

グラム陰性菌において遊離内毒素を制御する他の方法がある。1つは、弱アルカリ加水分解からなる。例えば、培地を 80℃ および pH 10 で加熱する。この処理は、内毒素を不活化させるが、多くの細菌性抗原、特にタンパクを破壊する。

もう1つの方法は、あまり有効ではないが、限定された適用を有する。それは、グルタルアルデヒドを使用して、培養物を不活化させることからなる。グルタルアルデヒドは、有効な防腐剤であり、それは、培養物中の内毒素のほとんどを結合する。グルタルアルデヒドによる不活性化後、ボルデテラ (*bordetella*) 培養物は、約 1 マイクログラム (10<sup>-6</sup> グラム)/μl の遊離内毒素含量を有する。しかしながら、グルタルアルデヒドは、合成増殖培地における培養物中でのみ使用することができる。天然培地においては、タンパク溶解質がグルタルアルデヒドと

結合し、細菌に対するその作用を防止する。安全なボルデテラ (*bordetella*) ワクチンを製造するためのグルタルアルデヒドの使用は、1989年12月19日に発行された U.S.P. 4,888,169 (「ボルデテラ・ブロンキセプチカ・ワクチン」(*Bordetella bronchiseptica vaccine*)) に開示されている。

AMAP<sup>®</sup> の初期バージョン (AMAP<sup>®</sup> マーク 1) は、慣用の量の A/gel に対して培地を希釈して、ゲルの結合力を最適に調節することによって特徴付けられる。AMAP<sup>®</sup> マーク 1 は、抗原能力を低下させずに内毒素性ショックを除くという目的を満足させた。

この領域の研究者は、最近、AMAP<sup>®</sup> とは無関係ではあるが、AMAP<sup>®</sup> によって製造された生成物を含む、慣用の量の A/gel (約 10~25% v/v) を含有するすべての細菌ワクチンによる重要な問題に際対峙するようになった。これらのワクチンは、肝臓効果と称されるものを生じる。A/gel または他の無機担体は、容易には代謝されず、そこで、注射部位の組織中に残存する傾向にある。次いで、ゲルに吸着した細菌細胞および代謝産物は、組織中に捕獲される。それらは、内毒素、腫瘍を導き、最後に傷痕を残す慢性刺激を誘発する。これは、ワクチンを食肉用に飼育した動物の筋肉中に注射する場合に特に重大である。屠殺時に、影響を受けた肉片は、しばしば腐敗処分とされ、損失する。これは、死体の斑点によるトリム・ロス (trim loss) と称される。注射部位反応問題の発生は、評価できるほどの局所的反応性を生じない AMAP<sup>®</sup> の新しいバージョンを必要とすることを明確に示した。

#### 発明の概要

本発明は、濃縮グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な結合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の結合能を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなり、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非濃縮抗原調製物または最終ワクチンに添加する場合よりも少ないことを特徴とする新規グラム陰性菌ワクチン製造方法を提供するものである。

本発明は、また、本発明の方法によって製造されたワクチンを提供するもので

もある。

さらに、本発明は、改良が 5.0% v/v 未満のワクチン中の無機担体の濃度からなることを特徴とするグラム陰性菌ワクチンを提供するものである。

さらに、本発明は、ワクチン中の無機担体の量が、濃縮グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な結合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の結合能を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなる方法によって予め限定され、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非濃縮抗原調製物または最終ワクチンに添加する場合よりも少ないことを特徴とする無機担体からなるグラム陰性菌ワクチンを提供するものである。

さらに、本発明は、本発明のワクチンの有効量を動物に投与することを特徴とするグラム陰性菌感染に対して動物にワクチン接種する方法を提供するものである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、従来技術の方法における前記問題を解決する。本発明によると、抗原調製物にわずかに高い濃度の無機担体を添加することによって、グラム陰性菌の濃縮抗原調製物中で内毒素を制御することができる。例えば水または生理食塩水で、該調製物をワクチンにおいて必要とされる濃度に希釈すると、無機担体の最終濃度は、實質的に低下し、置くべきことに、内毒素は、しっかりと結合されたままである。本発明の方法によって製造されたワクチンは、ワクチン接種された動物において、良好な効力、優れた全身安全性およびほんのわずかな注射部位反応性を有することが証明された。

本明細書に記載する場合、「濃縮グラム陰性菌抗原調製物」は、最終ワクチンよりも非常に高い抗原含量を有する抗原調製物を意味する。一般に、濃縮調製物は、最終ワクチンの抗原濃度よりも少なくとも約 10 倍高い、好ましくは 40~50 倍高い抗原濃度を有する。濃度の上限は、調製物と一様に作用する能力によって支配される。すなわち、作用するが困難であるほどに濃くあるべきではない。下限は、ワクチン中の無機担体の最終濃度を低下させる要望によって支配される。

非濃縮培養液またはそのフラクションが濃縮に類するこの標準に適合する場合もある。しかしながら、ほとんどの場合、該液は濃縮しなければならない。これらは、運心または当業者に知られている他の方法によって調製することができる。抗原調製物が濃縮されればされるほどますます、ワクチンの組立ての間に希釈され、最終再構成ワクチン中の担体の濃度が低くなる。細菌抗原調製物の好ましい濃度は、例えば、調製物が吸着され、最終ワクチンに組立てられると、無機担体濃度が 5.0% v/v 未満であり、好ましくは、3.0% v/v 未満であるような濃度である。

置くべきことに、グラム陰性菌抗原調製物としては、例えば、全細菌菌液ならびに細菌抽出物および無菌培養液が挙げられる。これまでに、AMAP<sup>®</sup> は、全細菌調製物だけに対して好適であることが示された。

本発明で使用する事ができるグラム陰性菌の例としては、サルモネラ (*Salmonella*)、イー・コリ (*E. coli*)、シゲラ (*Shigella*)、カンピロバクター (*Campylobacter*)、フソバクテリウム (*Fusobacterium*)、ホルデテラ (*Bordetella*)、パステラ (*Pasteurella*)、アクチノバシラス (*Actinobacillus*)、ヘモフィルス (*Haemophilus*) およびヒストフィルス (*Histophilus*) が挙げられる。

好適な無機担体としては、グラム陰性菌の遊離内毒素の結合能を有するものが挙げられる。例としては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ミョウバンまたはリン酸カルシウムが挙げられる。無機担体/抗原調製物中の遊離内毒素の濃度を低下させるのに有効な量の無機担体を濃縮抗原調製物に添加する。有効量は、内毒素をしっかりと結合し、抗原を非常にしっかりと結合して抗原刺激を阻害するほどには高くない量を投与する安全なレベルに遊離内毒素を低下させるのに必要な量を意味する。有効量は、巨大分子過剰と担体過剰との中間を要す。このバランスは、約 20~約 1000 EU/μl、好ましくは、約 20~約 500 EU/μl 投与量の吸着調製物中の遊離内毒素レベルによって示される。

20~500 EU/μl なる数字は、最終ワクチンには関連していない。一般に、遊離内毒素量は、この範囲内のままであるが、他の成分の影響に依存して、最終

ワクチンにおいては100 EU/μlに近づき、なお、許容される。増加は、おそらく、他の成分(グラム陰性菌、ウイルスなど)における巨大分子によってゲルから置換された内毒素に起因する。これは、ほとんどの家畜が10,000 EU/μlまで内毒素を含有するワクチンに耐えることができることが判明したので、安全性に影響を及ぼすとは思われない。

ワクチン開発の間、抗原調製物の濃度の程度が確立され、無機担体の量は、いくつかの実験バッチに対して測定される。これは、製造の間に濃縮物に添加されるべき担体の割合を設定する。

抗原調製物は、無機担体の結合部位に結合するか、または内毒素と担体上での結合部位について競争するその構成分子によって無機担体の結合力を調節する薬剤である。残存する結合力は、如何に多くの内毒素が結合させられるか、および如何にしっかりと結合させられるかを決定する。担体が添加されればされるほどますます、多くの遊離結合部位が残存し、最終にアッセイすることができる遊離内毒素は少なくなる。最終点を越えて担体を添加すると、過剰な結合部位が増加し、担体に対して親和性を有するすべての巨大分子しっかりと結合される。遊離内毒素はゼロであるが、抗原の結合は、特異的な免疫原によって抗原刺激を阻害するほどしっかりとしている。

本発明の方法では、細菌細胞を使用する場合、一般に、少なくとも90%の増地が濃縮の間に脱落される。したがって、培養物は、増地に対する細菌由来の保護的抗原(免疫原)の損失を最小限にする方法で管理され、かつ、不活化されるべきである。これは、まず、不活性化剤を、使用する場合には、培養物が増殖サイクルの指数(「対数」)期である場合に添加すべきであることを必要とする。この段階では、実質的には、細胞の100%が生きており、分裂しており、したがって、それらの構造の保全は完全である。増殖速度が遅くなるとすぐに(転位期(transition phase)、多数の細菌が、死滅または乾燥し、分解し始め、抗原および内毒素の両方を放出する。不活性化剤は、好ましくは、固定剤、すなわち、細胞構造を結合させ、分解を防止する試薬であるべきである。

ホルムアルデヒド溶液(ホルマリン)は、最も広範囲に有用な不活性化剤であ

る。ホルマリンは、細菌細胞の死滅化の間、内毒素を多少放出させるが、これは、本発明の方法によって、増地から容易に除去される。培養物が不活化された後、さらなる損失はほとんどない。グルタルアルデヒドは、より有効であり、増地中にすでに遊離している内毒素を結合させる。遊離内毒素は、実際には、不活化の間に減少する。しかしながら、前記のとおり、グルタルアルデヒドは、完全な合成増地における培養物中でのみ使用することができる。

該調製物は、ワクチン用に増地される。該ワクチンは、補助剤、さらなる無機担体および当業者に公知の種々の他の抗原などの他の成分を含有してもよい。

本発明のもう一つの利点は、本発明のワクチンの有効量を動物に投与することと特許とするグラム陰性菌感染に対する動物のワクチン接種方法を提供するものである。ワクチンの有効量は、免疫性誘発性を有する量である。有効量は、抗原によって変わり、当業者によって容易に決定される。

以下の実施例は、本発明方法を使用するグラム陰性菌由来の好例のワクチンの調製、ならびにこれらのワクチンの安全性および効力を説明する。これらの実施例は、単に説明的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例1 イー・コリ(E. coli)ワクチンの調製

アイオワ州エイムズのナショナル・アニマル・ディジーズ・センター(National Animal Disease Center)からのイー・コリ(E. coli)菌株NADC 1471(ピルス(pilus)型K99)を、毎天プレート上で18~32時間またはフラスコ中で12~32時間、37℃で、下記の合成増地中で増殖させる。

生増殖サイクルは、斜度増殖しつつ、4~12時間である。イー・コリ(E. coli)増殖用合成増地は、次のとおり調製する: 2.0g NH<sub>4</sub>Cl、4.50g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および17.0g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を蒸留水中で合わせ、NaOHでpHを7.4±0.2単位に調整し、該混合物をオートクレーブに付して滅菌する。MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O(0.05g)、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O(5.0g)およびグルコース(5.0g)の溶液を、各々、濃縮物として別々に調製し、逐次滅菌し、基本増地に加えた。所望により、増殖サイクルの間、発酵培養物に栄養補足物を添加す

る。該補足物は、発酵培養物1g当たり以下の最大量の成分を提供する: 9.12g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、34.0g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.0g MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.1g FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oおよび15.0gグルコース。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>およびNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を蒸留水中で合わせ、オートクレーブに付して滅菌する。MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oおよびグルコースの溶液を、各々、濃縮物として別々に調製し、逐次滅菌する。

本発明方法に従って培養物を不活性化するためには、不活性化剤であるホルマリン(ホルムアルデヒド溶液 USP)を該培養物に加えて、濃度を約0.5% v/vにする。該培養物を、低速攪拌しつつ、37℃±1℃で、発酵器中で一晚不活化する。

濃縮工程については、不活化培養物をシャープルズ連続流遠心器(Sharples continuous flow centrifuge)に通し、ペーストとして細菌を沈殿させる。別法としては、該細菌を標準的な条件下で遠心機によって濃縮する。細菌を、最終ワクチン中の濃度の10倍の値に、すなわち、1×10<sup>10</sup>細菌/μlに濃縮する。濃縮物中の細菌数は、ペトロフ-ハウザー(Petroff-Hauser)法またはコールター(Coulter)カウンターによって測定する。次いで、免疫原の量または抗原投与量が0.2μl中に含有され、最終投与量が2μlになるように、濃縮物をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH 7.2±0.2)によって希釈する。

pH 6.5で測定することによって、最終20% v/vまでのリハイドラゲル(Rehydralgel™)担体の添加の結果、濃縮物中270 EU/μl(3バッチの平均)の遊離内毒素が得られたことを測定した。この値は、測定の終点として選択された20~500 EU/μlの最も好ましい範囲内である。この結果、この量の担体が濃縮懸濁液に添加され、吸着が生じる。

ワクチン組成物を調製するためには、得られた吸着濃縮物12.5μlをPBSで最終容量100μlに希釈する。この12.5μlは、再懸濁細菌10μlおよびゲル2.5μlからなる。したがって、ワクチン中、初期細胞懸濁液を所望のワクチン10(2μl投与量中0.2μl)に希釈し、ゲルは、最終濃度2.5% v/vで存在し、最も望ましい標準<3% v/vに適合する。メルチオラート

(merthiolate) 10%溶液を保存剤として組み立てられた濃縮物に添加する。

メルチオラートの最終濃度は、0.01%重量/容量を超えない。

前記に従って調製したワクチンの抗原性を以下のとおり試験した。マウス20匹に、各々、ワクチンの20倍希釈液0.2μl、すなわち、ウシの投与量の40分の1を皮下注射した。3週間目に、マウスから採血した。マウスからの血清試料を、毎々に、K99ピリ(pili)を有するイー・コリ(E. coli)菌株1471から調製した不活化抗原に対して凝集試験で測定した。それらの血清は、平均凝集力価13を有した。

#### 実施例2 アクチノバシラス・プリウロニウモニエ(A. Pleuropneumoniae)ワクチンの調製

本発明方法によって、ワクチン用にアクチノバシラス・プリウロニウモニエ(Actinobacillus Pleuropneumoniae)血清型1(菌株シェルフ(Schellkopf); ドクター・シュルツ(Dr. Schultz)、アイオワ州アガカ)、血清型5(菌株K-17; ドクター・シュルツ(Dr. Schultz)、アイオワ州アガカ)および血清型7(菌株WF-83; スミス・クリン・ビーチャム・コーポレーション(SmithKline Beecham Corporation))を調製した。37±1℃で4~24時間、液体増地[ギブコ・ラボラトリーズ(Gibco Laboratories)、バクテリア(Bacteria) HP増地、フォーミュラ#90-5066]中で3種のアクチノバシラス・プリウロニウモニエ(A. Pleuropneumoniae)菌株を増殖した。無菌空気による通気および攪拌によって、増殖濃度を30%に制御した。無菌消泡液を使用して泡を制御し、増地に接種する前に添加した。無菌5N NaOHまたは4N HClの添加によって、培養物のpHを7.3±0.2に維持した。

指数増殖の最後に、各培養物を20℃の温度に冷却し、増殖を停止させた。冷却培養物を遠心し、沈殿物を、非常に濃い細菌の懸濁液として回収した。該懸濁液を、攪拌しつつ1時間、56℃±1℃で加熱した。次いで、該懸濁液を遠心し、上澄み液(抽出液)を回収した。無菌10%メルチオラートおよび10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液を、各々、最終濃度0.01%および0.07

% (重量/容量) で保存剤として添加した。該抽出物を無菌0.45および0.3  $\mu$ m フィルターを通し、組み立てるまで2℃〜7℃で貯蔵した。

ワクチンを以下のとおり調製した。フェノール法によって各抽出物の炭水化物含量を、ロウリイ (Lowry) 法によってタンパク含量を測定した。次いで、グルタルアルデヒドとの反応によって、抽出物中の分子を結合または連結させた。合計タンパク1g当たり1.5%の割合でグルタルアルデヒドの25%溶液を抽出物に添加した。次いで、グルタルアルデヒド溶液1.5%当たりリシン12.5%の割合でリシンの溶液を該抽出物に添加して、残存グルタルアルデヒドを中和させた。この混合物を室温で2時間、攪拌しつつインキュベートし、4℃で一晩貯蔵した。

3つの血清型の抽出物をそれらの炭水化物アッセイ値に従って合わせた結果、ワクチン投与量2.5%は各血清型の炭水化物20  $\mu$ gを含有した (10  $\mu$ g/0.5ml)。水酸化アルミニウムゲルによる吸収前に、合わせた菌体の容量をバッチの最終容量の1/40に調整した。これは、少量のPBSの添加を必要とした。

測定によって、pH 6.5で、調製した菌体にリハイドラゲル (Rehydrigel™) 担体を通量物100.0ml当たりゲル3.9%の割合で添加して、最終濃度2.8% v/vにした後、遊離内毒素を、20〜500 EU/mlの範囲内である470 EU/mlに減少させた。

製品1.5%を調製するために、各血清型の充分量を容易に添加して、炭水化物10.000  $\mu$ g (10mg) を与えた。PBSを添加して、容量を2.5%にした。次いで、リハイドラゲル (Rehydrigel™) 担体9.75% (2.5%の39%) を添加した。pHを6.5に調整し、該混合物を室温で1時間攪拌した。次に、アンフィゲン (Amphigen) アジュバント [ハイドロニクス、インコーポレイテッド (Hydronics, Inc.)] の40%エマルジョン12.5% (最終容量の8分の1) を添加して、ワクチン中最終5% v/vアンフィゲン (Amphigen) アジュバントを得た。次いで、PBSのさらなる添加によって、容量を1%に増加させた。かくして、リハイドラゲル (Rehydrigel™) 担体の最終濃度は、注射部位での組織反応の回避のために非常に望ましい値である0.98% v/vであった。

実施例3 アクチノバシラス・プリコニウムモニエ (A. Pleuropneumoniae)

さなかった。

#### B. 効力

2回目のワクチン接種の1週間後、血清型1、菌株シェルクップ (Schelkopf) (1.74  $\times 10^8$  コロニー形成単位 (CFU) /ml)、血清型5、菌株K-17 (7.1  $\times 10^7$  CFU/ml)、または血清型7、菌株WF 83 (1.65  $\times 10^8$  CFU/ml) のいずれかの生菌ビルレント培養物でブタの免疫性を鼻腔内攻撃した (0.5ml/鼻孔)。攻撃前に、グループAのブタ3匹、グループBのブタ4匹およびブラシーボグループのブタ6匹が無関係の原因で死亡した。攻撃後に死亡したブタは、できる限り早く剖検に付した。生存しているブタは、7〜8日目に殺して実験した。

剖検では、各ブタの肺を計量した。次いで、肺炎性肺炎を切開し、計量し、肺炎重量を肺の総重量のパーセントとして算出した。別に、化膿性肺炎、肺組織性肺炎、および胸腔中の漿液についての重量度のスケールに従って、ブタを評価した。結果を下記表にまとめる。

各血清型で抗原投与されたブタの肺損傷パーセントの統計学的分析 (マン-ホイットニイ (Mann-Whitney) U 試験) によって、下記第1表に示すとおり、グループAおよびブラシーボグループならびにグループBおよびブラシーボグループ間に有意な差 ( $\alpha = 0.05$ ) が示された。関連肺病変スコアの統計学的分析 (マン-ホイットニイ (Mann-Whitney) U 試験) によって、グループAおよびブラシーボグループならびにグループBおよびブラシーボグループ間に有意な差が示された。グループAおよびB間の損傷パーセントおよび病変スコアの小さな差は、有意ではなかった。

#### ワクチンの安全性および効力

この実施例は、実施例2に記載の方法に従って調製したワクチンの安全性および効力を説明する。

##### A. 安全性

前記実施例2に記載に従って、同一の抽出物から2つのワクチンを調製した。1つは、本発明の方法によって調製した：すなわち、実施例2に記載のリハイドラゲル (Rehydrigel™) 担体でグルタルアルデヒド結合抗原物質を吸着させた (生成物A)。他方は、水酸化アルミニウム担体の代わりにさらなるPBS 9.75%を用いてグルタルアルデヒド結合物質から調製した (生成物B)。ブラシーボとして、アンフィゲン (Amphigen) 補助剤 (PBS中5%) からなる混合物を調製した。

離乳した (3〜4週齢) ブタを任意に3つのグループに分け、これら3つの生成物の1つを首の側部に筋肉内注射した。各ブタに3週間おきに適切なワクチン2.5%を投与した。以下の数のブタを生成物に対して分けた：生成物A (65)、生成物B (35)、およびブラシーボ (40)。

色素感生性LAL試験でアッセイすると、生成物Aは投与当たり0.546  $\mu$ gの遊離内毒素含量を有し (希釈後に測定した)、生成物Bは投与当たり9.638  $\mu$ gを含有することが判明した。アクチノバシラス・プリコニウムモニエ (A. Pleuropneumoniae) ワクチンについて、投与当たり約1  $\mu$ g未満の内毒素レベルを有するのが好ましい。グループAでは、本発明の方法によって、ブタ投与用ワクチンを調製し、ブタ65匹のうち1匹は、最初の投与の後に一過性の不自然呼吸を示した。該グループの残りは、全身反応を示さなかった。グループBでは、慣用のワクチンを投与した後、ブタのほとんどが、ワクチン接種後2〜3時間、硬直、呼吸困難、および鬱病によって特徴付けられる典型的な内毒素性ショックを示した。グループBのブタ35匹のうち30匹が最初の注射の後にショックを示し、8匹が2回目の注射の後にショックを示した。ブラシーボのグループは、全身反応を示さなかった。

いずれのグループのブタも、臨床学的にまたは剖検で検出可能な局所反応は示

第1表  
剖検での平均値

抗原投与血清型	ワクチン	病変%	病変スコア
1	グループA	4.1	2.5
	グループB	3.8	2.7
	ブラシーボ	8.4	5.3
5	グループA	3.9	2.6
	グループB	3.8	2.2
	ブラシーボ	7.8	5.1
7	グループA	3.2	1.8
	グループB	2.4	1.4
	ブラシーボ	7.2	4.7

これらの結果から、本発明に従って調製したワクチンAが慣用のワクチンBと同様に有効であり、同様に注射部位反応を示さなかったことが判明する。しかしながら、ブタのほとんどにおいて内毒素性ショックを誘発した慣用のワクチンとは対照的に、ワクチンAは、ほとんど全体的に全身反応性を示さなかったことが証明された：ブタ65匹のうち1匹の一過性の不自然呼吸は、内毒素性ショック独特のものではないと思われた。

概して、本発明の方法によって、効力の損失なしで、重要なことには、許容されない注射部位反応を導入せずに、内毒素性ショックを取り除くという所望の効果が達成された。

本発明の多くの変形例およびバリエーションは、本発明に含まれ、当業者に明らかであると思われる。本発明のかかる変形例および別法および方法は、以下の請求の範囲の範囲に含まれると思われる。

国際調査報告		International application No. PCT/US73/00944																
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (IPC) : C13H 1/36; A61K 3402 US CL : 415/545; 434/92 Answering to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 415/545; 434/92 Documentation reported other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base searched during the international search phase of data base and, when practicable, search terms used AJP, CA, MEDLINE, BIOSIS, WPI Search terms: thymidine hydrazide, adenosine, nucleoside, nucleoside, group negative, B. Cell, plasmagamma																		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to this No.																
X	US, A, 4,433,577 (Synthesis of 1) 19 June 1984, one entire document.	1-3, 6-18 4-5																
X	US, A, 4,703,688 (Chemical structure of 1) 30 November 1987, one entire document.	1-3, 6-18 4-5																
X	US, A, 4,402,863 (Dibenzene) 14 August 1984, one entire document.	1-6, 10 7																
X	US, A, 5,019,385 (Structure of 1) 10 May 1991, one entire document.	1-3, 6-18 4-5																
X	US, A, 5,191,819 (Synthesis of 1) 31 March 1993, one entire document.	1-3, 6-18 7-9																
X	Aldrich 3 product literature, issued 1989, Research Laboratories Division of Research Inc., one entire document.	7-10																
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family sheet.																		
General categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*1</td> <td>Document defining the general state of the art which is not regarded as to be part of particular references</td> <td>*2</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> </tr> <tr> <td>*3</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> <td>*4</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> </tr> <tr> <td>*5</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> <td>*6</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> </tr> <tr> <td>*7</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> <td>*8</td> <td>Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art</td> </tr> </table>			*1	Document defining the general state of the art which is not regarded as to be part of particular references	*2	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*3	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*4	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*5	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*6	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*7	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*8	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art
*1	Document defining the general state of the art which is not regarded as to be part of particular references	*2	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art															
*3	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*4	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art															
*5	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*6	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art															
*7	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art	*8	Document containing information which is not considered to be relevant to the present invention but which is considered to be relevant to the prior art															
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report																
08 February 1993		22 FEB 1993																
Name and address of the ISA/ Communication of Results and Transmittal		Authorized officer																
US PCT Washington, D.C. 20541		D. BABNO																
Filing date: NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 395-5196																
Form PCT/ISA/210 (Revised March 1992)																		

フロントページの続き

(72)発明者 スウェリンゲン, リロイ・エイ  
 アメリカ合衆国ネブラスカ州68510、リン  
 カーン、サウス・サーティサード・ストリ  
 ート 934番

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成8年(1996)12月3日

【公表番号】特表平7-501333

【公表日】平成7年(1995)2月9日

【年通号数】

【出願番号】特願平5-509495

【国際特許分類第6版】

A61K 39/02

【F I】

A61K 39/02

9284-4C

## 手続補正書

平成 8 年 7 月 1 5 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 5 年特許願第 5 0 9 4 9 5 号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ファイザー・インコーポレイテッド

3. 代理人

住所 〒546

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル

青山特許事務所

電話(06)949-1261

FAX (06)949-0361

氏名 赤田士 (6214) 青山 部

4. 補正命令の日付

日付(出願審査請求と同時)

5. 補正の対象

請求の範囲

6. 補正の内容

別紙の通り

(54頁)

補正した請求の範囲

1. 菌種グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な割合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の割合を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなり、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非菌種抗原調製物または最終ワクチンに添加する場合よりも少ないことを特徴とするグラム陰性菌ワクチンの製造方法。

2. 無機担体の有効量が約20〜約1000内毒素単位/μlの範囲の低菌調製物中の遊離内毒素濃度によって示される請求項1記載の方法。

3. 無機担体が水酸化アルミニウムゲルである請求項1記載の方法。

4. グラム陰性菌抗原調製物がイー・コリ(E.coli)からなる請求項1記載の方法。

5. グラム陰性菌抗原調製物がアクチノバシラス・プリアリニューモニエ(Actinobacillus pleuropneumoniae)からなる請求項1記載の方法。

6. グラム陰性菌抗原調製物が最終ワクチンの少なくとも10倍濃縮されている請求項1記載の方法。

7. 請求項1記載の方法によって製造されたワクチン。

8. 改良が5.0%w/w未満であるワクチン中の無機担体の濃度からなる改良グラム陰性菌ワクチン。

9. ワクチン中の無機担体の量が、菌種グラム陰性菌抗原調製物を供給し、内毒素および抗原の最適な割合を生じるのに有効な量の、抗原調製物中の遊離内毒素の割合を有する無機担体で該調製物を吸着させ、次いで、該吸着調製物をワクチン用に希釈することからなる方法によって予め測定され、ワクチン中の無機担体の量が、無機担体を非菌種抗原調製物または最終ワクチンに添加されるよりも少ないことを特徴とする無機担体からなるグラム陰性菌ワクチン。

10. 請求項7、8または9のワクチンの有効量を10以上の動物に投与する

ことを特徴とする細菌物をグラム陰性菌感染症に対してワクチン接種する方法。